

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11031

研究課題名(和文)健康寿命延伸に向けたデセン酸のメタボリックシンドローム予防機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of metabolic syndrome prevention mechanism of decenoic acid for extending healthy life expectancy

研究代表者

寺尾 晶 (Terao, Akira)

東海大学・生物学部・教授

研究者番号：10451402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ローヤルゼリーにはその有効成分としてデセン酸およびデカン酸が知られている。特にデセン酸は、ローヤルゼリーに特有の成分であり、その含有量によってローヤルゼリーの品質が決定される。ローヤルゼリーのメタボリックシンドローム改善効果を基準に置いた上で、酵素分解ローヤルゼリー、デセン酸、デカン酸の効果を検証した。その結果、血中のグルコースおよび中性脂肪において高脂肪食群に対し、ローヤルゼリー群、デセン酸群、デカン酸群の値が有意に改善した。このことからローヤルゼリーの効果の一部はデセン酸あるいはデカン酸によってもたらされることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近成人にも褐色脂肪が存在し実際に機能していることが明らかにされ、肥満やメタボリックシンドロームとの関係で大いに注目を集めている。近年、茶カテキンや唐辛子カプサイシン等の食品成分が、褐色脂肪を活性化させて熱産生を促進することが示されている。実験動物での成績と対応してヒトでも類似の効果が報告されており、褐色脂肪を活性化する食品成分の探索が進んでいる。本研究ではローヤルゼリー特有成分であるデセン酸あるいはデカン酸がメタボリックシンドローム改善効果を持つことを示し、ローヤルゼリーの作用機構の一端を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Decanoic acid and decanoic acid are known as the active ingredients of royal jelly. In particular, decenoic acid is a component peculiar to royal jelly, and its content determines the quality of royal jelly. The metabolic syndrome improvement effect of royal jelly and protease-treated royal jelly were examined. Its effect of decanoic acid and decanoic acid, which are the active ingredients of royal jelly, were also examined. As a result, royal jelly, decanoic acid, and decanoic acid significantly improved the blood glucose and triglyceride levels as compared with the high-fat diet group. This suggests that some of the effects of royal jelly are brought about by decenoic acid and/or decanoic acid.

研究分野：栄養科学

キーワード：褐色脂肪細胞 ローヤルゼリー デセン酸 メタボリックシンドローム 睡眠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代日本では、健康上の問題がなく日常生活を普通に送ることができる期間である健康寿命と平均寿命の差は約 10 年間もあるとされている。この期間は介護が必要となる可能性が高く、本人のクオリティ・オブ・ライフだけでなく、介護する側の負担も問題視されている。健康寿命が延伸する社会の実現に向けて対策の柱となるのが、メタボリックシンドロームの予防である。ローヤルゼリーは多くの有効成分を含み、古くから健康全般に役立つ健康食品として珍重されているが、最近、高血糖とインスリン抵抗性を改善し、メタボリックシンドローム予防効果があることが明らかとなってきた。我々は、高脂肪飼料の給餌によりメタボリックシンドロームを発症させた食餌性肥満モデルマウスにおいて、ローヤルゼリーを与えると代謝的熱産生組織として知られる褐色脂肪に局在する脱共役タンパク質 1 (Uncoupling Protein:UCP1) の発現が上昇し、体脂肪量が減少することを見出した。UCP1 が活性化するとミトコンドリアでの酸化リン酸化が脱共役され、脂肪酸やグルコースの酸化分解で生じたエネルギーが ATP 合成に使用されず直接熱へと変換される。その結果、エネルギーが散逸消費されて肥満が解消すると共にインスリン感受性を高め、グルコース処理が促進され、高血糖が改善したと考えられた。ローヤルゼリーには三大栄養素であるタンパク質・炭水化物・脂質をはじめとして、ヒトの健康に不可欠な必須アミノ酸の全てを含む 21 種のアミノ酸、各種ビタミン・ミネラルなど 40 種類以上もの栄養素を含む。自然界ではローヤルゼリーのみに含まれる、10-ヒドロキシ-2-デセン酸(デセン酸)は、ヒト体内では合成できない脂肪酸の一種であり、デセン酸含有量がローヤルゼリーの品質を決めると言われるほど重要な成分である。ローヤルゼリーの血糖値やコレステロール値の低下作用、癌抑制作用などはデセン酸によるものであると考えられているため、ローヤルゼリーの有効成分としての可能性を検討した。

2. 研究の目的

ローヤルゼリーの有効成分と考えられるデセン酸に注目し、そのメタボリックシンドローム改善作用を明らかにする。更にメタボリックシンドロームと同時に発症する睡眠の質低下についてもその作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)実験動物

全ての動物実験は東海大学動物実験委員会で承認を得たうえ、研究室で保有する「飼育管理作業マニュアル」ならびに「標準操作手順書」に基づいて行った。実験用のマウスは、 22 ± 2 、昼夜 12 時間サイクル(明期:06:00~18:00、暗期:18:00~6:00)環境下、自由摂食および自由摂水条件下で飼育した。マウスは 1 週間の飼育環境馴化期間を経た後、平均体重が均等になるように群分けを行い、以下の条件にて 4 ヶ月間飼育を行った。通常食(ND)群、高脂肪食(HFD)群、高脂肪食にローヤルゼリーを添加した(RJ)群、高脂肪食に酵素分解ローヤルゼリーを添加した(pRJ)群、高脂肪食にデセン酸を添加した(デセン酸)群、高脂肪食にデカン酸を添加した(デカン酸)群。毎週月曜日と金曜日にマウスの体重を測定した。凍結乾燥した RJ、pRJ は重量比で 5%となるようにして高脂肪食飼料に添加した。使用した RJ に含まれるデセン酸の含量は 4.38%であった。このことからデセン酸は重量比で 0.219% (5×0.0438)となるようにして高脂肪食飼料に添加した。デカン酸も重量比で 0.219%となるようにして高脂肪食飼料に添加した。

(2)自発運動量

赤外線行動量センサー(バイオテックス、京都)にて評価を行った。

(3)摂食量

1 週間に与える餌の重量を予め計測しておき、1 週間後にケージ内の床敷を篩にかけて食べ残した餌と床敷、糞等を完全に分け、食べ残した餌の重量を測定した。与えた餌の重量から食べ残した餌の重量を引いた値を 7 日間で割り、1 日あたりの摂食量とした。

(4)脳波、筋電活動の測定

イソフルラン吸入麻酔下で、脳波および筋電活動測定用の電極留置手術を行った。脳波測定用の 2 つのビス(直径 1mm:ニューロサイエンス、東京)を、左大脳半球の頭蓋骨上(前方のビス:プレグマから前方へ 1mm・左側へ 1.5mm、後方のビス:ラムダから前方へ 1mm・左側へ 1.5mm)に留置し、アース用のビスを右鼻骨上に留置した。筋電活動測定用の 2 本の絶縁ワイヤー(Cooner wire:Cooner Wire Inc., Chatsworth, CA, USA)は、左右の頸部僧帽筋上にそれぞれ留置した。手術後、マウスに鎮痛剤(インドメタシン:1mg/kg、富士フィルム和光純薬、大阪)を腹腔内投与した後、抗生物質剤(ペニシリン G:20,000U/kg、Meiji Seika ファルマ、東京)を筋肉内投与した。2 週間の術後回復期間の後、マウスを脳波、筋電活動、および自発運動量測定用のケー

ジ (300×210×210mm、照度 100Lux) に移し、マウス頭部の電極に脳波および筋電活動測定用のケーブルを接続した。5 日間の順化期間の後、脳波、筋電活動、および自発運動を VitalRecorder® (キッセイコムテック、松本) にて明期の始め (6:00) から 3 日目の 6:00 までの 48 時間連続的に記録した。脳波および筋電活動の信号は、バイオアンプによって増幅 (脳波: 5,000 倍、筋電活動: 1,000 倍) した後、フィルタリング (脳波: 0.5-30Hz、筋電活動: 16-128Hz) を施し、サンプリングレート 128Hz でデジタル化した。基本的には 2 日目の 24 時間をデータ解析に用いたが、アーチファクトの混入などによりデータに不備があった場合には、1 日目の 24 時間を解析に用いた。

(5) 睡眠・覚醒ステージ (non-Rapid Eye Movement (NREM) 睡眠、REM 睡眠、覚醒) の判定
睡眠・覚醒ステージは連続的に記録した脳波、筋電活動、および自発運動量データを基に SleepSign® ver. 3 (キッセイコムテック株式会社、松本) を用いて、10 秒を 1 エポック (解析の最小単位) として判定した。まず脳波を 1 エポックごとに高速フーリエ変換することで、各エポックの脳波強度 (μV_2) を 0.5Hz 毎に算出した。一般的に、NREM 睡眠時はデルタ波と呼ばれる 0.5~4Hz 領域の脳波強度が高くなり、REM 睡眠時はシータ波と呼ばれる 6~10Hz 領域の脳波強度が高くなる。また、NREM 睡眠時や REM 睡眠時は覚醒時と比較して筋電活動が低い。そこで本研究では、「デルタ波強度が高く、かつ筋電活動が低いエポック」を NREM 睡眠、「シータ波強度の割合が高く、かつ筋電活動が低いエポック」を REM 睡眠、「自発運動がある、または筋電活動が高いエポック」を覚醒と判定した。具体的には、自動判定アルゴリズムを個体ごとに設定し、そのアルゴリズムに従い自動判定された睡眠ステージを目視にて再確認し、誤判定を修正したものを最終的な睡眠・覚醒ステージ判定結果とした。

(6) 睡眠・覚醒の解析

24 時間における覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠について、各々の時間 (分) を合計した。

(7) 睡眠・覚醒単位 (発生回数と平均持続時間) の解析

ヒトは一晚にまとまった睡眠をとる単相性睡眠を示すのに対し、多くの動物は昼夜を通して比較的短い睡眠単位 (エポック) を繰り返す多相性睡眠を示す。本実験で使用した SAMP8 マウスは、秒~分単位で NREM 睡眠、REM 睡眠、覚醒を繰り返し、その総数は 1 日に 600 回にも達する。そこで、24 時間における覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠について、各々の発生回数および平均持続時間 (分) を算出した。覚醒量あるいは各睡眠量と発生回数および平均持続時間の間には以下の関係が成り立つ。量 (分) = 発生回数 (回) × 平均持続時間 (分)

(8) 睡眠・覚醒エピソード長のヒストグラム

覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠について、それぞれのエポック接続時間に対して 24 時間における度数分布を調べた。エポック接続時間を 10 秒、20 秒、30~40 秒、50~80 秒、90~160 秒、170~320 秒、330~640 秒、650~1280 秒、1290~2560 秒、2560 秒以上に分けて集計し、それぞれの発生回数をヒストグラムで表した。

(9) NREM 睡眠時の脳波強度周波数分布

NREM 睡眠と判定されたすべてのエポックの 0~20Hz 周波数領域の脳波強度を 1Hz 毎に算出した。次に各個体の 0~20Hz 周波数領域の脳波強度の合計を 100% とした時の、各周波数領域における脳波強度の割合を 1 時間毎に算出した。その値を 24 時間にわたって平均したものを、NREM 睡眠時の各周波数領域の「各個体のノーマライズした脳波強度 (%)」とした。結果はその値を群毎にまとめた。

(10) 組織の採取

睡眠実験終了後、マウスを 1.5% イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈から全採血した後、心停止を確認した。マウスの安楽殺後、褐色脂肪組織を採取して重量を測定した。

(11) 統計学的解析

実験データは平均値 ± 標準誤差で示した。実験データの比較には、一元配置分散分析を行い、事後検定として Scheffé's F test を用いた。

4. 研究成果

(1) 摂食量と自発運動量

ND 群は $3.6 \pm 0.1g$ 、HFD 群は $3.8 \pm 0.1g$ と大きな差はなく、飼料の違いは摂食量に影響を与えなかった。他の群についても差はなく、RJ、pRJ、デセン酸、デカン酸の添加はマウスの摂食量に影響を与えなかった。ND 群は $14,659.4 \pm 1484.2$ 回、HFD 群は $13,902.3 \pm 900.3$ 回と大きな差はなく、飼料の違いは一日の自発運動量に影響を与えなかった。他の群についても差はなく、RJ、pRJ、デセン酸、デカン酸の添加はマウスの自発運動量に影響を与えなかった。

(2)体重増加量

ND 群の $12.9 \pm 0.6\text{g}$ に対して、HFD 群は $25.3 \pm 0.8\text{g}$ であり、体重増加量が 196% (ND 群比) となった。RJ 群は $18.1 \pm 0.7\text{g}$ と HFD 群に対して有意差があり、抗肥満作用を認めた。一方、pRJ 群は $26.1 \pm 0.9\text{g}$ 、デカン酸群は $20.4 \pm 0.8\text{g}$ 、デカン酸群は 21.7 ± 0.7 であり抗肥満作用を認めなかった。

(3)褐色脂肪組織重量

ND 群の $60.9 \pm 3.0\text{mg}$ に対して、HFD 群では $202.1 \pm 14.3\text{mg}$ であり、食餌性肥満により、褐色脂肪組織重量が 332% (ND 群比) と有意に増加した。RJ 群は $127.8 \pm 10.7\text{g}$ と HFD 群に対して有意差があり、褐色脂肪組織重量の低下作用を認めた。一方、pRJ 群は $211.8 \pm 16.5\text{g}$ 、デカン酸群は $151.5 \pm 12.9\text{g}$ 、デカン酸群は 154.7 ± 13.5 であり褐色脂肪組織重量の低下作用を認めなかった。

(4)血中グルコースと中性脂肪

ND 群の $6.2 \pm 0.5\text{mmol/L}$ に対して、HFD 群では $17.4 \pm 4.2\text{mg}$ であり、食餌性肥満により血中グルコース濃度が 281% (ND 群比) と有意に上昇した。RJ 群は $11.4 \pm 2.1\text{g}$ 、デカン酸群は $10.9 \pm 2.0\text{g}$ 、デカン酸群は 11.1 ± 1.9 と HFD 群に対して有意差があり、血中グルコース濃度の低下作用を認めた。一方、pRJ 群は $211.8 \pm 16.5\text{g}$ であり、血中グルコース低下作用を認めなかった。血中中性脂肪についても同様の結果が得られた。

(5)ノンレム睡眠量

ND 群は 639.3 ± 22.6 、HFD 群は 630.8 ± 14.7 分と大きな差はなく、飼料の違いは NREM 睡眠量に影響を与えなかった。RJ 群は 617.4 ± 27.2 分、デカン酸群は 636.2 ± 20.1 分、デカン酸群は 622.2 ± 20.1 分といずれの群においても大きな違いは認められなかった。

(6)短時間覚醒

食餌性肥満により影響を受けた覚醒のエピソード長が 10 秒、20 秒のものをまとめて、短時間覚醒と定義した。ND 群の 85.9 ± 9.0 回に対して、HFD 群では 212.5 ± 11.7 回であり、食餌性肥満により、短時間覚醒の発生回数が 247% (ND 群比) と有意に増加した。RJ 群は 107.3 ± 14.4 回と HFD 群に対して有意差があり、短時間覚醒発生回数の低下を認めた。一方、pRJ 群は 224.4 ± 15.1 回、デカン酸群は 125.9 ± 17.4 回、デカン酸群は 141.3 ± 17.9 回であり、短時間覚醒発生回数の低下を認めなかった。

(7)NREM 睡眠 (発生回数と平均持続時間、エピソード長)

NREM 睡眠発生回数は ND 群の 235.0 ± 10.1 回に対して、HFD 群では 374.1 ± 16.6 回であり、食餌性肥満により、NREM 睡眠の発生回数が 159% (ND 群比) と有意に増加した。RJ 群は 274.0 ± 16.5 回と HFD 群に対して有意差があり、NREM 睡眠発生回数の低下を認めた。一方、pRJ 群は 381.5 ± 13.6 回、デカン酸群は 308.0 ± 13.8 回、デカン酸群は 311.4 ± 14.6 回であり、NREM 睡眠発生回数の低下を認めなかった。NREM 睡眠平均持続時間は ND 群の 2.8 ± 0.2 分に対して、HFD 群では 1.7 ± 0.1 分であり、食餌性肥満により、NREM 睡眠平均持続時間が 60.7% (ND 群比) と有意に短縮した。RJ 群は 2.5 ± 0.2 分と HFD 群に対して有意差があり、NREM 睡眠平均持続時間の延長を認めた。一方、pRJ 群は 1.6 ± 0.3 回、デカン酸群は 2.1 ± 0.3 回、デカン酸群は 2.0 ± 0.3 回であり、NREM 睡眠平均持続時間の延長を認めなかった。24 時間に出現した全ての NREM 睡眠エピソードに対して、どのエピソード長を持つ NREM 睡眠の発生回数が最も影響を受けたのかを調べた。まず、「エピソード長が 20 秒の NREM 睡眠」に注目すると、ND 群の 6.6 ± 1.2 回に対して、HFD 群では 30.1 ± 4.5 回であり、食餌性肥満により、その発生回数が 456% (ND 群比) と有意に増加した。RJ 群は 11.8 ± 3.1 分と HFD 群に対して有意差があり、「エピソード長が 20 秒の NREM 睡眠」の発生回数に対して正常化作用を認めた。一方、pRJ 群は 29.8 ± 5.1 回、デカン酸群は 16.4 ± 3.4 回、デカン酸群は 17.5 ± 3.1 回であり、「エピソード長が 20 秒の NREM 睡眠」の発生回数に対して正常化作用を認めなかった。一方で、「エピソード長が 640 秒の NREM 睡眠」に注目すると、ND 群の 25.8 ± 2.9 回に対して、HFD 群では 11.8 ± 1.8 回であり、食餌性肥満により、その発生回数が 46% (ND 群比) と有意に減少した。RJ 群は 20.4 ± 3.1 分と HFD 群に対して有意差があり、「エピソード長が 640 秒の NREM 睡眠」の発生回数に対して正常化作用を認めた。一方、pRJ 群は 10.4 ± 2.1 回、デカン酸群は 16.1 ± 3.3 回、デカン酸群は 17.5 ± 3.0 回であり、「エピソード長が 20 秒の NREM 睡眠」の発生回数に対して正常化作用を認めなかった。

(8)NREM 睡眠時の脳波強度周波数分布

睡眠時の脳波は主に 0.5Hz ~ 4Hz のデルタ波成分と 6Hz ~ 10Hz のシータ波成分から構成されており、NREM 睡眠時の脳波にはデルタ波成分が、REM 睡眠時の脳波にはシータ波成分が強く現れる。ND 群の NREM 睡眠時における脳波強度周波数は 4.0Hz をピークとした分布を示した。RJ 群、pRJ

群、デカン酸群、デカン酸群についても ND 群と同様の脳波強度周波数分布を示し、NREM 睡眠時の脳波成分構成に 6 群間で違いは認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Izawa S., Yoneshiro T., Kondoh K., Nakagiri S., Okamatsu-Ogura Y., Terao A., Minokoshi Y., Yamanaka A., and Kimura K.	4. 巻 600
2. 論文標題 Melanin-concentrating hormone-producing neurons in the hypothalamus regulate brown adipose tissue and thus contribute to energy expenditure.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Physiol.	6. 最初と最後の頁 815-827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP281241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 寺尾 晶	4. 巻 15
2. 論文標題 Neural Assembly仮説	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 睡眠医療	6. 最初と最後の頁 355-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terao, A., Sato, M., Sugiura, C.	4. 巻 71
2. 論文標題 Melinjo (Gnetum gnemon L.) seed extract rescues fragmented non-rapid eye movement sleep in mice with diet- induced obesity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kihara M., Kaiya H., Hirai, Y., Katayama H., Terao A., and Nishikawa M.	4. 巻 137
2. 論文標題 Salmon acyl-ghrelin increases food intake and reduces doxorubicin-induced myocardial apoptosis in rats, likely by anti-oxidative activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2020.170471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izawa S., Chowdhury S., Miyazaki, T., Mukai Y., Ono, D., Inoue R., Ohmura Y., Mizoguchi H., Kimura K., Yoshioka M., Terao A., Kilduff T. S., and Yamanaka, A.	4. 巻 365
2. 論文標題 REM sleep active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus dependent memories.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1308-1313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aax9238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤 眞土、杉浦千瑛、寺尾 晶
2. 発表標題 メリンジョは食餌性肥満マウスの断片化した睡眠を改善する
3. 学会等名 日本睡眠学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 眞土、杉浦 千瑛、寺尾 晶
2. 発表標題 メリンジョは食餌性肥満マウスの断片化した睡眠を改善する
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Terao A., Yoneshiro T., Kaede R., Nagaya K. Saito M., Aoyama J., Elfeky, M., Okamatsu-Ogura Y., Kimura K.
2. 発表標題 Melinjo seed extract induces uncoupling protein 1 expression in brown fat and protects mice against diet-induced obesity and insulin resistance
3. 学会等名 32nd Annual Meeting of European College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年～2021年

1. 発表者名 Terao A., Yoneshiro T., Kaede R., Nagaya K. Aoyama J., Saito M., Okamatsu-Ogura Y., Kimura
2. 発表標題 Brown adipose tissue is involved in anti-obesity effects of royal jelly in high fat diet-fed mice
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関